

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-127160

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)5月31日

G 01 N 33/53
33/543
33/577

D-7906-2G
E-7906-2G
A-7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 5 (全8頁)

⑮ 発明の名称 特異的蛋白質の検出方法

⑯ 特 願 昭62-161979

⑰ 出 願 昭62(1987)6月29日

優先権主張 ⑱ 昭61(1986)6月30日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭61-153707

㉑ 発 明 者 米 田 祐 康 富山県富山市曙町1-16

㉒ 出 願 人 米 田 祐 康 富山県富山市曙町1-16

㉓ 代 理 人 弁理士 杉 林 信義 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

特 異 的 蛋 白 質 の 検 出 方 法

2. 特許請求の範囲

(1) 複数の互いに異なるエピトープ(抗原決定基)

に対するモノクローナル抗体、または、ポリクローナル抗体と特異性の高いモノクローナル抗体一種の組み合わせによって、前処理用濾過装置で障害物質を除いた被検試料中の検出を目的とする蛋白質(またはペプチド)を認識、検出するにあたり、一つのまたは複数のモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体を固定した検出用試験紙片上に、検出を目的とする蛋白質を結合させ、コロイド状金属粒子に結合せしめた、もう一つのモノクローナル抗体(一方にポリクローナル抗体を使用した場合は特異性の高いモノクローナル抗体)を検出剤として試験紙片上に金属コロイド粒子によって迅速に着色させることで、検出、確認することの特徴とす

る特異蛋白質(またはペプチド)の検出方法及び検出に要する器具、容器一式。

(2) 特許請求の範囲第1項記載の検出法において、

検出を目的とする蛋白質またはペプチドに対するモノクローナル抗体の一つまたは同一抗原に対する複数のモノクローナル抗体もしくは、ポリクローナル抗体を含む緩衝液を、吸収性担体としてのナイロンメンブランフィルターに含浸させ風乾後、スキムミルク等ブロッキング剤を用いて抗体結合部位以外の部分をブロックすることを特徴とする被検試料中の特異蛋白質(またはペプチド)の検出用試験紙片。

(3) 特許請求の範囲第1項記載の検出方法において、

特許請求の範囲第2項記載で用いたモノクローナル抗体とは異なる別の、同一抗原に対するモノクローナル抗体(ポリクローナル抗体を使用した場合は特異性の高いモノクローナル抗体)を結合せしめたコロイド状金属粒子を、検出液としてそのまま使用するか、ないしは緩衝液とともに凍結乾燥末とし用時溶解して使用するこ

とを特徴とする被検試料中の特異蛋白質（またはペプチド）検出用試薬。

(4) 特許請求の範囲第1項記載の検出方法において、特許請求の範囲第2項記載の試験片と第3項記載の試薬とを組み合わせキットとし、被検試料中の特異蛋白質（またはペプチド）を簡便かつ迅速に検出することを目的とするキットに用いられる容器、器具一式。

(5) 特許請求の範囲第1項記載の特異蛋白質（またはペプチド）検出法において使用する器具として、検出精度を高めるために行う被検試料の前処理に用いる、スキムミルク等でコーティング処理したフィルターを主とする被検試料の前処理用濾過装置。

3. 発明の詳細な説明

（産業上の利用分野）

本発明は免疫学的反応を応用した微量特異蛋白質の簡便かつ迅速な検出方法およびこれに用いる試験紙片、試薬、キット並びにこれに用いる容器・器具一式に関する。

測されるように、高い信頼性を有するものでなくてはならない。例えば、疾病の診断を誤りなく下すためには、ある特定の蛋白質のみを特異的に検出するという高い精度が要求される。

次に高感度であること、例えば疾病の診断においては、いうまでもなくなるべく初期の段階で正しい診断の下されるのが望ましい。そのためには、極微量の特異的蛋白質でも検出できることが必要である。

更に、検出するための操作が簡単で、いつでもどこでも使用でき、しかも迅速に結果が得られ、その結果の保存と運搬が可能であることも欠くべからざる要素である。

特異的蛋白質の検出方法として、従来最も汎用されているのが、免疫学的抗原抗体反応を応用した検出法である。これは抗体が特異的に抗原物質を認識し、結合するという性質に基き、抗原となる特異蛋白質を認識する抗体を作成し、これを用いて被検試料中の特異蛋白質と抗原抗体反応させ、その結果を例えば凝集反応等二次

この検出方法の応用範囲は、基礎研究分野における各種特異蛋白質検出キット、臨床用の各種診断薬、農薬、畜産薬、水産業における各種疾病検出キット等である。

（従来の技術および発明が解決すべき問題点）

特異蛋白質（またはペプチド）を検出する目的として、主に基礎的研究と各種疾病の診断等臨床用の応用があげられる。

このうち、基礎研究において、例えば生化学や免疫学領域では、特異蛋白質の検出は欠くことのできぬ手段であることはいうまでもない。また、臨床における診断にも特異的蛋白質の検出は必須の要素となっている。すなわち、ある疾病において、その疾病に特異的な蛋白質（例えばホルモン、酵素等）が体液中に放出されることがあるが、その特異的蛋白質を検出することで、疾病の診断を下せるだけでなく、経時的に追跡検出することで、疾病の経過を知ることが可能である。

特異的蛋白質の検出は、前述の意義からも推

的な現象や標識を用いて検出するものである。

このような検出法は、更にその検出する程度に従い、定性的検出法と定量的検出法に大別される。すなわち、定性的検出法は、ある一定量以上の蛋白質の有無を、発色等簡便な手段で検知するもので、一般には臨床用の診断薬等に应用されている。

これに対し、定量的検出法は、定量的に特異的蛋白質を測定するシステムで、定性的検出法に比べ、より高い感度と精度を有するため、厳密な基礎研究や臨床診断に汎用されている。

次に従来最も広く使用されている特異蛋白質検出法で、臨床用の診断薬に应用されている代表例を以下にあげる。

- (1) 赤血球の凝集反応を応用した方法
- (2) ラテックス凝集反応を応用した方法
- (3) ラジオイムノアッセイ法（RIA法）
- (4) エンザイムイムノアッセイ法（EIA法）

このうち、凝集反応による(1)赤血球の凝集反応を応用した方法及び(2)ラテックス凝集反

応を応用した方法では、特別な設備や、高度な測定装置を要せず、簡便に検出できるが、感度が低く、また判定し難いため、ミスジャッジの多いものであった。最近、これらの方法において感度を高めるために抗体を特異性の高いモノクローナル抗体に変える等、改良が加えられているが、いずれにせよその基本原理は抗原抗体反応の結果を間接的な現象で確認しているため、克服されえない点が残る。

これに対し(3)、(4)のイムノアッセイ法は、免疫検定法といい、1959年にS. A. BersonとR. Yalowによって開発されたラジオイムノアッセイ法は、今日欠くことのできない検出法として定着しているが、この方法の原理は抗原抗体反応を何らかの形で定量化し、抗原あるいは抗体を直接的に測定するものである。ここでその手段として抗原あるいは抗体を何かで標識する方法を標識イムノアッセイ法と呼ばれ、この標識を元に定量化するものである。ラジオイムノアッセイ法は、標識として高感度の放射性同

位体を使用しているため極めて微量の蛋白質抗原でも定量的に検出できるので、基礎研究のみならず、臨床診断にも多大の貢献をしてきた。

しかし、ラジオイムノアッセイ法を行うには、放射性物質を使用するため、特殊な施設を要し、更に取り扱いに高度の注意を必要とする。また、今日社会問題となっている放射性物質の廃棄のこともあり、今後有用な手段とは言い難い一面もある。

そこで、最近最も注目を浴びているのが(4)のエンザイムイムノアッセイ法である。これは標識として酵素を用いる標識イムノアッセイ法で、これには種々の測定方法があるが、最も実用的なサンドイッチ法について述べる。

抗原に特異的な抗体を二種類用意し、一方を固相に結合せしめ、他方を標識となる酵素に結合し複合体を得る。まず、抗体を結合せしめた固相に被検試料液を加え、よく洗浄して未反応物質を除去した後、酵素-抗体複合体を反応させると、固相表面上に抗体-抗原蛋白質-複合

体なる「サンドイッチ」状の結合物が生成する。次に余剰の複合体を完全に除去した後、固相表面上に結合した複合体の酵素活性を測定することで、被検試料中の特異抗原蛋白質を定量するというものである。

この検出法で問題となるのは、未反応の酵素-抗体複合体を完全に除去しなければならないことである。これは、感度を高めるために高比活性の酵素を使用するため、僅かでもこの複合体が残存していると、測定上のバックグラウンドが高くなってしまうのである。この欠点は、標識として酵素を用いる限り免れ得ないもので、未反応液を充分に除去するという操作上の難点を除くことはできない。従って、このエンザイムイムノアッセイ法のサンドイッチ法を応用した簡便な定性的検出法も幾つか考案されているが、いずれも上述の問題があるため、厳密な判定が得られないという問題点を抱えている。

しかし、今日最も要望されている検出法は、特殊な設備や装置を要せず、簡便な操作でしか

も精度が高く信頼しうるデータを迅速に出せる検出法である。例えば、臨床面で緊急に診断を要する時や、術後の経過を追跡する時など、あとの処理を準備するためにも正確な判断をしかも迅速に下すことが必須である。その判断材料ともなる診断薬の結果に高い精度と迅速性が求められているわけである。

(問題点を解決するための手段)

そこで、本発明はこの要求を満たすべく、従来の検出法でなし得なかった高感度で高精度に微量特異蛋白質を簡便かつ迅速に検出しうる方法を鋭意努力して開発したものである。

本発明は、複数の互いに異なるエピトープ(抗原決定基)に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と特異性の高いモノクローナル抗体一種によって、検出を目的とする特異蛋白質をサンドイッチ状に挟んで認識せしめ、試験紙片上に直接有色のスポットとして可視的に検出することを特徴とする特異蛋白質検出法である。

すなわち、モノクローナル抗体とは「ただ一つの抗原決定基のみに対する純粋な抗体」（『生物学辞典』第三版、岩波書店）と定義される如く、通常の抗体（モノクローナル抗体に対しポリクローナル抗体と呼ばれる）に比較して抗原に対する特異性が格段に高い。そこで、この性質を利用して従来の抗原抗体反応を応用した特異蛋白質検出法でこのモノクローナル抗体により精度を高める改良がなされている。

しかし、そもそもエピトープは必ずしもある蛋白質にのみ特異的であるとはいえず、中には複数の異った蛋白質に共通するものもある。そのため、ある種の蛋白質では特異的な検出が困難とされ、これを克服するために多大の時間と労力を費して、特異的な抗原決定基に対するモノクローナル抗体の検索が盛んに行われているのが現状である（例えば特開昭60-236069号）。本発明では、こうした高い特異性をもつ高価なモノクローナル抗体をあえて使用せずとも、相異なる複数のエピトープに対するモノクローナ

ル抗体を使用して、極めて微量の特異的蛋白質まで検出可能とする方法を開発したもので、以下にこれを説明する。

ある蛋白質を特異的に認識する方法として、本発明では二重の抗原抗体反応による認識で検出の精度を高め特異性を上げた。また、その検出手段として標識イムノアッセイ法の直接的検出法を応用し、検出物質としてコロイド状金属粒子（金属コロイド粒子）を使用した。これら金属コロイド粒子はそれぞれの物理的性質から独自の色調を帯びており、これにより、抗原抗体反応の結果を直接的に可視的に表示することができ、免疫化学の研究分野では公知のものである。

このコロイド状金属粒子の代表例として、コロイド状金粒子（以下金コロイドと呼ぶ）があるが、これは四塩化金酸をある特定の条件下でコロイド状にしたもので、金コロイドの粒子径に従いピンク色から赤紫色に着色する。この金コロイドと蛋白質をある条件下におくと非共有

的、静電的吸着によって結合し、安定したコンジュゲート（共役体）を形成する。これは化学修飾を要しない結合のため、蛋白質の変性は起こらずまた生理活性の低下もみられないという特徴があり、すでに免疫組織学領域では従来の蛍光抗体法や酵素抗体法に代わりうる顕微鏡用の免疫染色剤として公知のもので古くから使用されている。この金コロイドに代表される金属コロイド粒子を特異蛋白質の検出物質として採用した。

この金属コロイドを利用した特異蛋白質検出法が既にゾル粒子免疫測定法（SPIA法）として報告されており（特開昭55-15100）、また、金属コロイドのうち金コロイドを用いた臨床診断薬（商品名「プレディクターカラーD」）も市販されている。その原理は金コロイド-抗体コンジュゲート（共役体）溶液中に被検試料を加え、試料中の抗原物質と抗体による免疫沈降反応により起るコンジュゲートの凝集を、それに伴う金コロイド溶液の退色（赤色から無色）

をもって判定するものである。この検出方法は時間がかかるうえ（約30分）、感度も低く（hCGが尿1リットル中に400国際単位以上）、特に検出物質が微量の場合は、退色が不鮮明で判定が難しく、時間が経過すると陰性でも退色する等、精度の点でも問題が残りの、さらに判定の結果を保存することはできない。このような問題点を克服すべく、本発明では、溶液状態での金属コロイドコンジュゲートの退色を利用するのではなく、誰にでも明確に判定ができ、尚かつその結果を保存できる方法を考案した。また、検出感度、検出精度を向上させるために、検出時のバックグラウンドの原因となる妨害物質を除く方法も合わせて考案した。

（作用）

第1図に本発明の基本原理を示した。これは複数の互いに異なるエピトープに対するモノクローナル抗体を用いる場合であるが、ここで、Pは検出を目的とする特異蛋白質（Protein）またはペプチド（Peptide）で、このP分子上の

「エピトープ1」に対するモノクローナル抗体をAntiPm₁、「エピトープ2」に対するものをAntiPm₂とする。

AntiPm₁は金属コロイド(M)とコンジュゲートを形成し、pH緩衝液を加え検出液とする。一方、AntiPm₂は吸収性担体(FP)に含浸させ、風乾後ブロッッキング剤(B、例えばウシ血清アルブミン等)を含む緩衝液中に浸して、非特異的な蛋白質との結合を防ぐためAntiPm₂が結合した部位以外のFP表面上をマスクする(AntiPm₂は複数種でも可能である)。

検出する時は一定量の被検試料液中の特異蛋白質PをFP上のAntiPm₂でとらえ、そこへコンジュゲートと反応させると、特異蛋白質PはAntiPm₁、AntiPm₂の両モノクローナル抗体により認識され、抗原抗体反応により図示される如く、吸収性担体FP上にAntiPm₂—特異蛋白質—AntiPm₁—金コロイドコンジュゲートの複合体が形成され、FP表面上に結合した複合体のみが有色のスポットとして残り確

認される。

ポリクローナル抗体と特異性の高いモノクローナル抗体を組み合わせて使用する場合は、前者をAntiPm₂、後者をAntiPm₁として考えれば良い。

これは一定量以上の特異蛋白質を、定性的に検出する方法として簡便な臨床用の診断薬等に応用できる。また、得られたスポットをデンストメーターによって定量的に測定することも可能である(第3図)。

また、吸収性担体(FP)に含浸させるAntiPm₂の量を段階的に変えたものを用意すれば、分析機器を要すること無く、いわゆる基礎生化学領域で多用されるドットプロット法と同じく、特異的蛋白質を半定量的に検出することもできる。

次にこの検出法において、検出を阻害する要因について考察を加えると、まず検出剤である金属コロイドが結合しているコンジュゲートが吸収性担体FP上に非特異的に結合すると、検

出のバックグラウンドが高くなる。しかし、これはFP表面の抗体が吸着している部分以外を、スキムミルクやウシ血清アルブミン(BSA)等でマスクし、金属コロイドコンジュゲートの試験紙表面での非特異的な結合を阻止した。

また、被検試料が原尿等の場合は、検出試験紙上に未知の物質が留まり、金属コロイドコンジュゲートを非特異的に試験紙上に捕え、検出のバックグラウンドを高くする現象が起り易いが、本発明では、これを克服する手段として、被検試料の前処理用濾過装置を考案した。これは、スキムミルク溶液及びpH緩衝液等でコーティングしたナイロンメンブランフィルターを用いた濾過装置である(第2図参照)。このコーティング処理により、濾過装置によるプレフィルトレーション(前濾過)中に被検試料中の検出を目的とする蛋白質が非特異的にフィルターに捕捉されることを防ぐことが可能となった。このプレフィルトレーションによって、被検試料中の非特異的な未知の妨害物質を除去すること

ができ、かつ至適pHに保てるので検出感度、検出精度共に飛躍的に向上した(表1参照)。

更に、反応液中での金属コロイドコンジュゲートの安定化を計るため、pH緩衝液と安定化剤等を、金属コロイドコンジュゲート溶液に加えた。

次に被検試料液中に検出を目的とする特異蛋白質P上のエピトープ2と同じエピトープを有する別の蛋白質が存在した場合であるが、P2は担体上のAntiPm₂と反応し結合するが、P上にAntiPm₁に対するエピトープ1が存在しなければコンジュゲートが結合せず、従って誤った検出はなされない。ここで問題となるのは、P2上にエピトープ1も存在している場合であるが、このときは他のエピトープに対するモノクローナル抗体を得ることで解決される。しかし、一般には二種の異なるエピトープを同じくする蛋白質が存在する確率はかなり低いものと考えられる。またポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を組み合わせる場合は、金属コロ

イドと共役体を作るモノクローナル抗体を特異性のなるべく高いものとする事で解決される。

以上のことから理解される如く、この検出法で検出できる特異蛋白質は二種以上のエピトープが存在しているか、その抗原に特異的なエピトープを持っていなければならない。一般に蛋白質はサブユニット構造をとっているものが多く、従って複数のサブユニットから成る蛋白質であれば、各サブユニット蛋白質の表面上のエピトープに特異的なモノクローナル抗体を複数得れば良いし、サブユニット構造をとらない蛋白質やペプチドでも、異なるエピトープが複数あれば本検出法によって特異的に検出されえる。

以上のように、本発明は複数のモノクローナル抗体または高い特異性を有したモノクローナル抗体とポリクローナル抗体による特異的蛋白質の認識によってその特異性を高め、精度を上げると共に、安定な金属コロイドを検出剤に用いて感度を高め、可視的に検出できるようにし

ル抗体では交叉性が高く、特にhLHによる偽陽性反応をめぐり去ることが出来なかった。特に、流産時の予後や子宮外妊娠の診断等極めて低濃度のhCGを検出する時は、全く使用できなかった。そこでhCGのβサブユニット、特にC末端から28～30番目までのアミノ酸配列部位は、hCG独自のものであるため、この部位をエピトープにするモノクローナル抗体を作り、hLH等との交叉性を少なくし、精度を高める努力がなされているが、そのためには高度の技術を要し、また多大の労力と時間を費さなければならない。

そこで本発明では、あえてこのような高価な抗β-hCGモノクローナル抗体を得なくても、高精度に特異的にhCGを検出できるシステムを目標に鋭意努力した。また、極微量のhCGを厳密かつ定量的に測定するシステムはすでにRIAやEIAで確立しているので、この実施例では簡便な操作で可能な定性的検出法を考案した。

た簡便かつ迅速な特異蛋白質検出法である。

(実施例および発明の効果)

本発明の実施例として、ヒトじゅう毛性性腺刺激ホルモン(hCG, human Chorionic Gonadotropin)の検出例をあげる。hCGは妊娠初期やある種のじゅう毛性、非じゅう毛性腫瘍で特異的に分泌されるホルモンである。現在、尿中に放出されたhCGを抗hCG抗体で検出する方法が各種考案されており、妊娠の診断はいうまでもなく、上記腫瘍の診断や治療の指標として汎用されている。

ところが、公知の如く、hCGはα、β両サブユニットからなる糖蛋白質ホルモンであるが、そのうちα-サブユニットは、hLH(human Luteinizing Hormone, ヒト黄体形成ホルモン), hFSH(human Follicle-Stimulating Hormone, ヒト卵胞刺激ホルモン), hTSH(human Thyroid-stimulating hormone, 甲状腺刺激ホルモン)の各サブユニットと非常に似た構造をとっているため、従来のポリクローナ

(1) モノクローナル抗体の作成

市販のhCGで免疫したマウスから得た脾臓を、公知の方法でマウスミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマ(Hybridoma)を得た。それらをクローニングし、各クローンにつき標準物質のα、βサブユニットを用い、ELISA法にてそれぞれ産生しているモノクローナル抗体の特異性を検定した。

α、β各サブユニットに対し特異的な抗体を産生するクローンを更に限界希釈し、サブクローニングすると、そのうちαは25%、βは40%のクローンに特異的な抗体の産生がみられた。これを増やし、常法通りマウスの腹腔に注射し、腹水を得、アフィニティーカラムにてモノクローナル抗体を精製した。

(2) hCG検出キットの作成例とその操作法

(2-1) 試験紙片法

上記(1)で得たモノクローナル抗体のうち、抗-αhCGモノクローナル抗体をフィルターに含浸させ、風乾後、BSA溶液等に浸し

ブロッキングを行い、これを風乾し、支持体に固定する。一方、抗 β -hCG抗体は、市販の金コロイド溶液と常法通り結合させた。

操作法は、前処理濾過装置にて処理した尿中に上記フィルターを一定時間（例えば1分間）浸し、尿中のhCGをフィルター上の抗 α -hCGモノクローナル抗体にとらえさせる。次に、このフィルターを金コロイドコンジュゲート中に入れ、しばらく静置する（約10分間）。その後フィルターを出し、流水で軽く濯いだ後風乾する。

陽性ではフィルター中央に赤紫色のスポットが確認される。陰性ではバックグラウンドがみられない。

(2-2) フィルター法

(2-1)と同様、二成分を得る。すなわち、抗 α -hCGモノクローナル抗体を含浸せしめたフィルターと、抗 β -hCGモノクローナル抗体と金コロイドコンジュゲートを用意し、前者を円筒状容器の上面に置き、その下

を吸湿性の高い物質で埋める（第2図参照）。被検尿をスポイトで採取し、これを濾過装置にてプレフィルトレーションを行ない、尿中のhCGをフィルター上に捕える。次に金コロイドコンジュゲート溶液を滴下する。陽性ならば直ちに中央に赤紫色のスポットが認められる。

(3) 性能

標準物質のhCGを用い、このキットの検出感度を調べた結果、表1の如く5 IU/lの低濃度のhCGが検出できた。これは従来の簡易検出法に比べ100倍以上の感度がある。またキットを(2-2)の例の如く作成すると、特異蛋白の検出は金コロイドコンジュゲートを加えると直ちにスポットとして確認される。この時、被検試料によっては夾雑物質のため、検出のバックグラウンドが高くなるものもあるが、本発明の前処理濾過装置を用いることで、検出のバックグラウンドが完全に消え、特異的な蛋白質の検出感度、検出精度を格段に高め

ることができる。また、この方法の所要時間は二分以内と、他に類を見ない迅速性を有している。更に得られた結果は検出試験紙上に残り、記録として保存が可能であるだけでなく、郵送等による運搬も可能である。この点は、従来汎用されている凝集反応を応用した各種検出キットではなし得なかったことで、特に臨床診断等正確さを要する場合には、欠くべからざる要素である。

また、表1に示すごとく、1億IU/lと非常に高濃度まで何ら検出を阻害されず、いわゆる「プロゾーン現象」と称される偽陰性がないため、被検試料を希釈せずに使用できる。

表1 hCG検出感度試験

hCG量 (IU/l)	0	2	5	10	20	50	100	500	1×10 ⁹
判 定	-	±	+	+	++	++	++	++	+++

+ : 陽性, - : 陰性

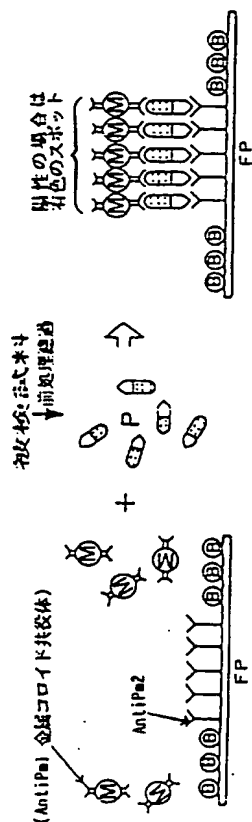
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の基本原理の一例を示す説明図である。第2図は本発明の実施例(2-2)を説明する図である。第3図は本発明の性能を明らかにする図である。

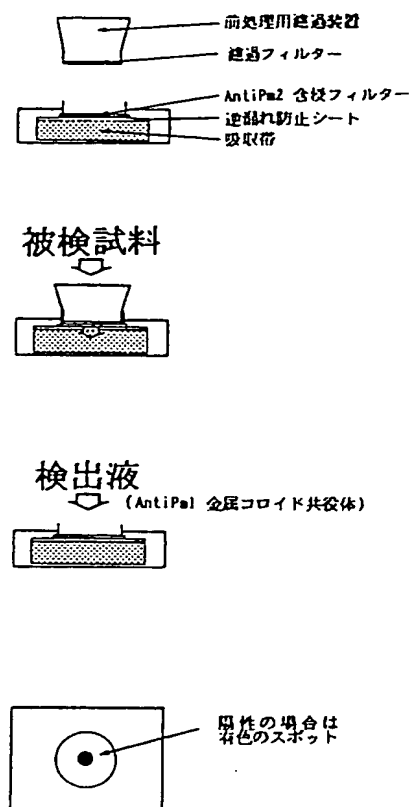
代理人 弁理士 賀 浦 清



第 1 図



第 2 図



第 3 図

